

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-272453

(43)Date of publication of application : 24.09.2002

(51)Int.Cl.

C12N 1/21
A61K 38/48
A61P 7/02
A61P 9/00
A61P 35/00
A61P 43/00
C12N 9/54
C12N 15/09
C12P 21/02
// C07K 1/18
(C12N 1/21
C12R 1:07)
(C12N 9/54
C12R 1:07)
(C12N 15/09
C12R 1:07)

(21)Application number : 2001-085117

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 23.03.2001

(72)Inventor : HASUMI KEIJI
NARASAKI RITSUKO
KURIBAYASHI HARUSHIGE
SATO TSUTOMU

(54) NEW ANGIOSTATIN-CONVERTING ENZYME, MICROORGANISM PRODUCING THE ENZYME,
METHOD FOR PRODUCING THE ENZYME, AND METHOD FOR PRODUCING ANGIOSTATIN AND
ACTIVE SERINE PROTEASE BY UTILIZING THE ENZYME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new angiotensin-converting enzyme, a microorganism producing the enzyme, a method for producing the enzyme, and the application as an activating agent of the enzyme.

SOLUTION: The producing microorganism is Bacillus megaterium A9542 strain (accession number: FERM P-18268). Bacillomycin MA of the enzyme produced by the microorganism, the gene of the microorganism, a neovascularization inhibitor containing an angiotensin-like fragment produced from a plasminogen by the action of the enzyme as an active ingredient, the activator of a plasma serine protease group containing the enzyme as an active ingredient, and a method for producing an angiotensin-like molecule and mini-plasminogen-like molecule by subjecting a plasminogen to limited digestion by using the enzyme are also provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

22.09.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-272453

(P2002-272453A)

(43) 公開日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/48		A 6 1 P 7/02	4 B 0 5 0
A 6 1 P 7/02		9/00	4 B 0 6 4
9/00		35/00	4 B 0 6 5
35/00		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-85117(P2001-85117)

(22) 出願日 平成13年3月23日 (2001.3.23)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月5日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌75巻
臨時増刊号」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 逆見 恵司

東京都稲城市向陽台5-9リベレ向陽台2-301

(72) 発明者 奈良崎 律子

東京都府中市天神町4-3-17プランシェ
佳寿101

(72) 発明者 栗林 春茂

長崎県諫早市原口町816-7

(74) 代理人 100110168

弁理士 宮本 晴視

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なアンジオスタチン変換酵素、該酵素の生産菌、該酵素の製造方法、該酵素の利用によるアンジオスタチンおよび活性型セリンプロテアーゼの製造

(57) 【要約】

【課題】 新規なアンジオスタチン変換酵素、該酵素の生産菌、該酵素の製造方法および該酵素の活性化剤としての使用の提供

【解決手段】 バチラス メガテリウム A9542株 (受託番号: FERMP-18268)、該微生物が産生する酵素であるバシロライシンMA、該微生物の遺伝子、該酵素の作用によりプラスミノゲンから生成するアンジオスタチン様断片を有効成分とする血管新生抑制剤、前記酵素を有効成分とする血漿セリンプロテアーゼ群活性化剤、前記酵素を用いてプラスミノゲンを限定分解してアンジオスタチン様分子およびミニプラスミノゲン様分子を製造する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 バチラス メガテリウム A9542 株 (受託番号: FERM p-18268)。

【請求項 2】 配列番号 1 に記載の細菌バチラス メガテリウム A9542 のバシロライシン MA 遺伝子。

【請求項 3】 配列番号 1 および 2 に記載のアミノ酸配列を持つ、プラスミノージェンを基質としてアンジオスタチン様プラスミノージェン断片を生成させる新規な酵素。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の酵素の作用により生成するプラスミノージェン断片を有効成分とする血管新生阻害剤。

【請求項 5】 血管新生の阻害剤としての有効成分がプラスミノージェンの Glu¹ から Ser⁴⁴¹ のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分とするものであることを特徴とする請求項 4 に記載の血管新生阻害剤。

【請求項 6】 血管新生の阻害剤としての有効成分として更に、プラスミノージェンの Phe⁷⁵ から Ser⁴⁴¹、Glu¹ から Val⁴⁴⁹、および Phe⁷⁵ から Val⁴⁴⁹ のアミノ酸配列を有するフラグメントからなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする請求項 5 に記載の血管新生阻害剤。

【請求項 7】 請求項 3 に記載の酵素の作用により生成するプラスミノージェンの Val⁴⁴² から Asn⁷⁹¹ のアミノ酸配列を有する断片を主たる有効成分とする血栓溶解剤。

【請求項 8】 請求項 3 に記載の酵素を有効成分とする血しょうセリンプロテアーゼ群活性化剤。

【請求項 9】 請求項 3 に記載の酵素が活性化する成分が、プロトロンビン、プロテイン C、プロウロキナーゼ、または血液凝固因子 X であることを特徴とする請求項 5 に記載の活性化剤。

【請求項 10】 バチラス メガテリウム A9542 株の培養液を、イソプロピルアルコール存在下に CM セルロースイオン交換クロマトグラフィーにかけける工程を含むことを特徴とする請求項 3 に記載の酵素を製造する方法。

【請求項 11】 プラスミノージェンを請求項 3 に記載の酵素により限定分解してプラスミノージェンの Glu¹ から Ser⁴⁴¹ のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分として含む血管新生阻害剤有効成分を製造する方法。

【請求項 12】 プラスミノージェンを請求項 3 に記載の酵素により限定分解してプラスミノージェンの Val⁴⁴² から Asn⁷⁹¹ のアミノ酸配列を有するフラグメント断片を主たる成分として含む血栓溶解剤有効成分の製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、細菌バチラス メガテリウム A9542 株 (受託番号 FERMP-18

268)、該細菌を起源とする新規なプロテイン (酵素)、該酵素の作用により生成するプラスミノージェン断片を有効成分とする血管新生阻害剤 (以下、血管新生阻害に有効なプラスミノージェン断片をアンジオスタチン様分子という。) または血栓溶解剤 (以下、該血栓溶解に有効なプラスミノージェン断片をミニプラスミノージェン様分子という。)、該酵素を有効成分とする血しょうセリンプロテアーゼ群活性化剤、更に該酵素を用いてプラスミノージェンを基質としてアンジオスタチン様分子およびミニプラスミノージェン様分子を製造する方法など関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、血管新生抑制剤が新しいガン治療戦略として注目されている。癌における血管新生の研究は最近非常に注目されている。癌細胞が増殖して 1~2 mm³ の大きさになると、さらに大きく成長するために多くの酸素と栄養が必要となることが解明されている。癌細胞は血管新生因子とよばれる血管新生を促す因子を放出し、近くの血管から新しい血管の造成を促して腫瘍内に血管を引き込むことにより、血液内の酸素と栄養物を利用して爆発的に増殖速度を増すことができるようになる。また、この腫瘍内微小血管を経由して遠隔転移が可能となる。

【0003】 前記癌成長における血管新生の役割を見ると、癌の血管新生を阻害することは、癌の増殖、浸潤、転移を抑制することにつながることは容易に理解できる。事実、多くの血管新生を阻害する薬剤が抗腫瘍剤として開発され、提案もされている (特開平 4-178328 号公報、特開平 6-234645 号公報、特開平 10-81631 号公報など)。しかしながら、現在までに血管新生阻害剤として承認された薬剤はない。血管新生を標的とする治療薬の開発は原発腫瘍の増大のみならず転移を阻止する可能性を有する。その一つであるアンジオスタチン (angiotatin) は血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を選択的に抑え、酸素や栄養分の供給を断ち、腫瘍の休止状態を引き起こすことが知られるところとなった (米国のフォークマン博士らにより、アンジオスタチンが発見されこのような概念が提唱された。)。また、アンジオスタチンは血管新生促進物質よりも循環血中での半減期が長いこと原発巣から離れた転移巣では阻害物質濃度が優位となり、転移巣の成長を抑制していると考えられている。さらに、内皮細胞のアポトーシスも増加させることも知られている。アンジオスタチンは、線溶因子であるプラスミノージェンのクリングル (kringle) 1-4 までを含む分子量約 38 kDa のペプチドである。従来、AG はインビトロではプラスミノージェンのエラスターゼ (elastase) による限定分解や、プラスミノージェンアクチベータを作用させ、プラスミンへと誘導した後、グルタチオン (glutathione) などの還元剤を作用させる

ことにより生産される。また、*in vivo*では数種のマトリックスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) によりアンジオスタチン変換は起こると考えられている。従来のアンジオスタチンを生産する技術は、(1) 前記タンパク質を分解するエステラーゼを用いる方法、および(2) 組み換えDNA技術を用いて、大腸菌で生産させる方法に大別することができる。しかしながら、前記従来の生産方法によると、アンジオスタチンへの変換の選択性が低い、得られたアンジオスタチンの活性の再現性が良くない、精製が難しいなどの問題点があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、基本的には前記アンジオスタチンの作用をする物質 (アンジオスタチン様分子)、および該物質を生産する方法、特に前記プラスミノーゲンを酵素により分解する方法の問題点、すなわち、基質特異性を改善したアンジオスタチンへの変換酵素を見出すことである。本発明者は、前記改善された酵素を見出すべく、種々の土壌から、微生物の代謝物として放出されるタンパク質の中に前記所望のアンジオスタチンへの変換特性を持ったものはないかと探索した。そして、東京都国分寺市東元町の土壌から、前記基質特異性を持つタンパク質を代謝物として放出する細菌を見出した。そして、本発明者は該細菌をA9542とし、産業技術総合研究所生命工学研究所の特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18268として、平成13年3月21日に受託された。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明の第1は、配列番号1に記載の塩基配列を持つタンパク質を代謝する細菌 *Bacillus megaterium* A9542 (受託番号FERM P-18268) であり、第2の発明は、配列番号1で表される前記細菌の遺伝子の塩基配列であり、本発明の第3は、前記細菌が代謝物として放出する、プラスミノーゲンを基質としてアンジオスタチン様断片を生成させる配列番号1および2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素であり、本発明の第4は、前記配列番号1および2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素の作用により生成するプラスミノーゲン断片を有効成分とする血管新生阻害剤であり、好ましくは、血管新生の阻害剤としての有効成分がプラスミノーゲンのGlu1からSer441のアミノ酸配列を有するフラグメントを主たる成分とするものであることを特徴とする前記血管新生阻害剤であり、より好ましくは、血管新生の阻害剤としての有効成分として更に、プラスミノーゲンのPhe75からSer441、Glu1からVal449、およびPhe75からVal449のアミノ酸配列を有するフラグメントからなる群から選択される少なくとも一種を含むことを特徴とする前記血管新生阻害剤である。発明の第5は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素の作用により生成するプラスミ

ノーゲンのVal442からAsn791のアミノ酸配列を有するフラグメント断片を主たる有効成分とする血栓溶解剤である。発明の第6は、前記配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素を有効成分とするプロトロンビン、プロテインC、プロウロキナーゼ、血液凝固因子Xなどの血しょうセリンプロテアーゼ群の活性化剤であり、本発明の第7は、前記細菌の培養液をイソプロピルアルコール存在下にCMセルロースイオン交換クロマトグラフィーにかける工程を含むことを特徴とする配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素を製造する方法である。本発明の第8は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を持つ酵素を用いて、プラスミノーゲンからアンジオスタチン様断片またはミニプラスミノーゲン様断片を製造する方法である。

【0006】

【本発明の実施の態様】本発明をより詳細に説明する。

A、本発明の細菌は東京都国分寺市東元町で採取した土壌から分離して得られたものであり、実施例中で記述する培養条件で培養し、培養液からプラスミノーゲンのアンジオスタチン様断片への変換を触媒する酵素を生産する微生物を見出し、以下のように同定された。

B、菌学的特徴

- 1、代謝生産物として、配列番号1および2に記載の酵素を産生する。
- 2、顕微鏡観察から桿菌である。
- 3、菌の大きさは、約3~6×0.8~1.0μmである。
- 4、グラム染色により紫色に染まりグラム陽性である。
- 5、芽胞染色から孢子形成菌である。
- 6、カタラーゼテストから、カタラーゼ陽性である。
- 7、嫌気条件で生育できないから、好気性である。
- 8、寒天培地での糖(D-(+)-グルコース、L-(+)-アラビノース、D-(+)-キシロース、D-(-)-マニトール)からの酸性産性する。以上の特性から、A9542株は、*Bacillus megaterium*と一致する。したがって、本菌を、*Bacillus megaterium* A9542株とした。

【0007】9、本菌の遺伝子は*Bacillus megaterium* nprE遺伝子と97%の相同性を示した。本菌は、翻訳産物レベルにおいてバシロライシンに対して10アミノ酸の相違が見られるアミノ酸配列 (配列番号2に示すとおりである) のタンパクを産生する。そこでA9542株の前記翻訳産物をバシロライシンMAとした。

【0008】C、本菌の生育条件

- 1、培地組成：ブレインハートインフュージョン (ニッスイ 05508)、牛脳エキス末21%、ペプトン28.6%、ハートエキス末23%、グルコース5.7%、NaCl 14.3%、リン酸水素ナトリウム7.

7%

2, 培地 pH: 7.0、

3, 培地の殺菌条件 121℃、15分、

4, 培養温度: 28℃

D, 本発明の菌は、経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所特許生物寄託センター受託番号 (FERM P-18268) として受託されている。

【0009】

【実施例】 実施例1

菌株の分離と培養

1, 分離

東京都国分寺市東元町で採取したの土壌 1g を、滅菌水 5mL に加え、良く攪拌してから、さらに 10^{-4} (w/v) に希釈し、以下の操作により培養し、プラスミノゲンからアンジオスタチン様断片を生成する活性を代謝物として放出する微生物を探索することにより実施した。

【0010】選択対象の菌の分離にはスターチカゼイン-寒天培地 (コーンスターチ 1%、カゼイン 0.03%、 KNO_3 0.2%、 NaCl 0.2%、 K_2HPO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%、 CaCO_3 0.002%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%、寒天 1.5%、ニスタチン (nystatin) 0.005%) を、用いた。希釈液 0.1mL をシャーレ中の培地上に塗布し、28℃で6日間培養した。生じたコロニーを釣菌し、スターチカゼイン-寒天培地からなる保存用スラント上において、28℃で適当な生育状態になるまで培養し、その後4℃で保存した。

【0011】2, 液体培養

選択対象の菌の液体培養には以下の培地を用いた。グルコース 1%、コーンスターチ 3%、大豆ミール (soybean meal) 1%、ペプトン 0.5%、イースト抽出物 (yeast extract) 0.5%、 CaCO_3 0.2%、CB442 0.01%、pH 7.0。液体培地 10mL の入った試験管 (21×210mm) に保存用スラント上から白金耳を用いて植菌し、28℃で6日間、振とう培養 (220ストローク/分) を行った。

【0012】実施例2

プラスミノゲンからアンジオスタチン様断片を生成する代謝産物を生産する微生物の選択

プラスミノゲンからアンジオスタチン様断片を生成する活性を生産する微生物の探索には、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [Nature 227, 680-685 (1979)] を用いた。微生物代謝産物の 90% メタノール抽出物を $1\mu\text{L}$ 乾固して、それに放射ラベルしたプラスミノゲン (^{125}I -Glu-Pig) (最終濃度 100nM、20000cpm) を $5\mu\text{L}$ 、uPA (ウロキナーゼ型 プラスミノゲン活性剤)

(最終濃度 200単位/mL) を $5\mu\text{L}$ ずつ加えて、TBS/Tバッファー (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.4) 中で 37℃、30分間インキュベートした。その後サンプルバッファー (3.6% SDS, 3.6%メルカプトエタノール, 0.08%プロモフェノールブルー, 900mg/mL 尿素) を $10\mu\text{L}$ 加え、湯浴中で 60℃、30分間処理、それを SDS-10% gel にアプライして泳動後、固定、乾燥を行い、オートラジオグラフィにかけてバンドのパターンを見た。プラスミノゲンと uPA のみを反応させたものを対象試料とした。本方法により、土壌から分離した約 1,500 株の放線菌、細菌、真菌の培養液をスクリーニングした結果、バチラス メガテリウム A9542 株の培養抽出液に強い活性を認めた (図1の2.)。図1は、1は微生物培養抽出液を含まない反応 (対照) で得られた結果であり、2はバチラス メガテリウム A9542 株の培養抽出液を含むで得られた結果であり、3は本発明の菌株以外のいくつかの菌の培養抽出液を含む反応で得られた結果を示す。

【0013】実施例3

バチラス メガテリウム A9542 株の培養液からの配列番号1および2のアミノ酸配列を持つタンパク質 (バシロライシン MA:BLMA) の精製
上記の液体培地 100mL を含む 500mL 容三角フラスコでバチラス メガテリウム A9542 株を 28℃、6日間、振とう培養後、培養液 3L をセライト (濾液の通過を容易にするための助剤) を用いて濾過し、その濾液 1L を H_2O で 5L に希釈し、イソプロピルアルコールを最終濃度 5% (v/v) と成るように添加した後、20mM、MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) - NaOH (pH 6.5) / 5% イソプロピルアルコールで平衡化したゲル 400mL のカルボキシルメチルセルロース (CM-Cellulose、生化学工業株式会社) カラムに流速 $15\text{mL}/\text{min}$ でアプライした。同じバッファー 600mL で洗浄した後、20mM、MES-NaOH (pH 6.5) / 5% イソプロピルアルコール / 0.2M NaCl で溶出した。その溶出画分を 60mL ずつ分画し、活性のあった画分を集めた。その純度を SDS-PAGE で確認 (図2) し、精製品 90mg を得た。なお、BLMA は本菌から分泌される際に限定分解を受け、本製造方法で得られる酵素蛋白質は、配列番号1に記載のアミノ酸番号 Val¹ から Glu³¹⁷ までの配列をもつ分子である。しかし、本発明による BLMA は、配列番号1に記載の配列の Pro⁻¹ から Glu⁻²⁵⁴ のいかなる部分をさらに含む分子であってもよい。

【0014】実施例4

BLMA によるプラスミノゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノゲン様断片の生成 (図3)

【0015】プラスミノゲン (Glu-Pig) を基質とするBLMAによる限定分解について観察した (測定: SDS-PAGE)。6 μ L の Glu-Pig (最終濃度2 μ M)、6 μ L の BLMA (最終濃度0, 3, 7, 37 nM) をCaCl₂ (最終濃度1 mM) を含むTBS/Tバッファー中で37℃、60分間インキュベートし、その後、非還元 SDS sample buffer (x4) を加え、そのうち15 μ L を、SDS-10% gel にアプライした。泳動終了後、Coomassie brilliant blue R-250で染色、乾燥した。その結果、プラスミノゲンはBLMA濃度依存的に開裂を受けた [BLMA 3, 7 nMで55%, 37 nMで86.5%のプラスミノゲンが開裂した (図3A)]。またBLMAによるプラスミノゲン切断を、血清50%、BL濃度0-1000 nMの条件下で行なった。2 μ L の 125I-Glu-Pig、3 μ L の BLMA (最終濃度0, 10, 100, 1000 nM)、5 μ L のヒト血清を加え、37℃、60分間インキュベートし、それに90 μ L の水を加えた。そこから5 μ L とって、それに5 μ L 還元 SDS sample buffer (x2) を加えた。

バシロライシンMAの作用により生ずるプラスミノゲン断片のN末端アミノ酸配列

フラグメント	各分析サイクルに出現したアミノ酸 (回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	E (3.9)	P (3.1)	L (1.8)	D (1.3)	D (2.3)
2	E (5.3)	P (5.0)	L (3.0)	D (0.8)	D (1.1)
3	F (3.3)	E (3.3)	K (3.7)	K (2.2)	V (1.8)
4	V (4.4)	V (5.0)	A (9.4)	P (6.1)	P (6.5)
5	L (4.4)	L (7.6)	P (2.3)	X (-)	V (6.0)

【0018】実施例5

BLMAによって生成するプラスミノゲンのアンジオスタチン様断片およびミニプラスミノゲン様断片の製造

2 mL の Glu-PLG (最終濃度2 μ M) に2 mL の CaCl₂ (最終濃度1 mM) と4 mL の BLMA (最終濃度36.8 nM) を加え、TBS/Tバッファー中で37℃、60分間インキュベートし、220 μ L のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (最終濃度5 mM) を加えて反応を停止させた。反応液をリジンセファロースカラム (4.6 x 50 mm) にアプライ後、1 mL の50 mMリン酸ナトリウムバッファーで溶出した。ミニプラスミノゲン様断片はこの画分に回収された。カラムをさらに0.5 MのNaClを含む50 mMリン酸ナトリウムバッファー1 mLで洗浄後、10 mLの0.2 Mイブシロンアミノカブロン酸 (EACA) で溶出した。溶出画分は1 mLずつ分取した。この画分をSDS-PAGEによる分析によりアンジオスタチン様断片の確認をし、目的の断片の検出された画分を集め、PBS (20 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.4) で一晩透析後、凍結乾燥を行なった。これにより、75 μ g のアンジオスタチン様断片を得た。なお、上記反応の容量、リジンセファロースカラムのサイ

そのうち5 μ Lを12.5% gel にアプライし、電気泳動した。泳動終了後一晩オートラジオグラフィにかけ、その後フィルムを現像した。ここでもBL濃度依存的に切断が進みアンジオスタチン様フラグメントが生成することが分かった [図3B、BLMA濃度はそれぞれ、1は0 nM、2は10 nM、3は100 nM、4は1000 nM。)]。

【0016】次に図3Aの切断された断片 (フラグメント、1-5) のN末端アミノ酸配列を同定したところ、表1のようになった。この結果から、BLMAはGlu-PigのSer⁴⁴¹-Val⁴⁴² (図3C、矢印3)、Leu⁷⁴-Phe⁷⁵ (図3C、矢印1)、Val⁴⁴⁹-Leu⁴⁵⁰ (図3C、矢印2) を切断し、プラスミノゲン分子の断片、Glu¹-Ser⁴⁴¹、Glu¹-Val⁴⁴⁹、Phe⁷⁵-Ser⁴⁴¹、Phe⁷⁵-Val⁴⁴⁹ (以上アンジオスタチン様断片) ならびにVal⁴⁴²-Asn⁷⁹¹、Leu⁴⁵⁰-Asn⁷⁹¹ (以上ミニプラスミノゲン様断片) を生成することがわかった。

【0017】

【表1】

ズおよび溶出液の容量は適宜変化させることができ、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0019】実施例6

BLMAによって生成するプラスミノゲンのアンジオスタチン様断片による血管内皮細胞の増殖の阻害 (図4)

ウシ毛細血管内皮細胞 (BCE細胞) を24穴組織培養プラスチックプレートに1穴当たり1.25 x 10⁴/mLの密度で1 mMビルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸混液および10%ウシ胎児血清 (FCS) を含むMEM培地0.5 mLを用いて播き込み、CO₂インキュベーターで24時間培養した。培地を5% FCS入りのMEM培地に交換した後、最終濃度が1 μ g/mLおよび10 μ g/mLになるようにPBSに溶解したアンジオスタチン様断片を10 μ L加えた。CO₂インキュベーターで30分間インキュベート後、6 μ LのPBSあるいは100 ng/mL塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を加え、CO₂インキュベーターで72時間培養した。培養後、培地を取り除き0.5 mLのPBSで2回洗浄し、100 μ Lの0.05%トリプシン、0.02% EDTA入りPBSを加え、37℃、5分間インキュベート後、10 μ LのFCSを入れてトリプシンの反応を停止した。この細胞懸濁液の細胞数を血球計

算盤で数えた。bFGFを添加しないとき、細胞数が2681に対して、bFGF存在下では3712となった。アンジオスタチン様断片を10 μ g/mL添加するとbFGF存在下でも細胞数は2337であった。つまり、アンジオスタチン様断片はbFGFに依存した血管内皮細胞の増殖を顕著に阻害することが示された(図4)。

【0020】実施例7

BLMAによって生成するプラスミノゲンのミニプラスミノゲン様断片の血栓溶解酵素プラスミンへの効率の変換(図5)

25 μ Lのプラスミノゲン(最終濃度100nM)あるいはミニプラスミノゲン様断片に25 μ LのuPA(最終濃度200単位/mL)、25 μ LのBLMA(最終濃度0-37nM)および25 μ Lのプラスミン基質S2251(最終濃度100 μ M)を加え、CaCl₂(最終濃度1mM)を含むTBS/Tバッファー中で37℃、3分ごとに0-60分まで405nmの吸光度を測定した。この反応で、ミニプラスミノゲン様断片(●)はプラスミノゲン(○)の5倍以上の速度でプラスミンを生成した(図5)。この結果から、ミニプラスミノゲン様断片はプラスミノゲンよりも優れた血栓溶解性を示すことがわかる。

【0021】実施例8

BLMAによるプロウロキナーゼ(pro-uPA)の活性化(図6)

BLMAによるpro-uPAの限定分解とそれに伴う活性化を以下のように観察した。まず、BLMAによってpro-uPAがどのような分子に開裂されているか

を調べるために、開裂パターンと、生じる断片の同定を行なった。6 μ Lのpro-uPA(最終濃度2 μ M)、6 μ LのBLMA(最終濃度0, 3, 7, 110nM)をCaCl₂(最終濃度1mM)を含むTBS/Tバッファー中で37℃、60分間インキュベートし、その後、非還元SDS sample buffer(x4)を加え、そのうち15 μ LをSDS-10% gelにアプライした。泳動終了後、Coomassie brilliant blue R-250で染色、乾燥した。さらに、ここで生じたフラグメントのN末端アミノ酸配列を同定した。タンパク質をSDS-PAGEで分画後、PVDF膜(PALLBIOSUPPORT GROUP FLUOROTRANS)へ転写した。膜をCoomassie brilliant blue R-250で染色、メタノールで脱色した後、目的のバンドを切り出し、476Aプロテインシーケンサー(Applied Biosystems)で分析した。BLMA3.7nMでpro-uPAの活性化開裂部位であるLys158-Ile159間の切断が起り(図6C中の矢印1)、A鎖(Ser1-Lys158)とB鎖(Ile159-Leu411)が生じた。BLMA110nMではpro-uPAのすべてが開裂され、さらにA鎖のがTyr24-Phe25間で切断され(図6C中の矢印2)、新たなフラグメントSer1-Tyr24およびPhe25-Lys158が生じた(図6A、Cおよび表2)。なお、これらの開裂により生ずる分子は互いにジスルフィド結合で連結されている。

【0022】

【表2】

バシロライシンMAの作用により生ずるウロキナーゼ断片のN末端アミノ酸配列

フラグメント	各分析サイクルに出現したアミノ酸(回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	I(24.5)	I(28.2)	G(17.9)	G(25.7)	E(9.6)
2	X(-)	N(2.9)	E(2.6)	L(1.9)	H(3.2)
3	S(4.6)	N(6.2)	E(5.2)	L(3.8)	H(8.0)
4	F(2.1)	S(2.0)	N(2.9)	I(2.9)	H(3.5)
5	F(15.8)	S(9.8)	N(11.9)	I(10.4)	H(10.3)

【0023】また、同様の実験を50%血清存在下で行なった。2 μ Lの¹²⁵I-pro-uPA(100,000cpm)、3 μ LのBLMA(図6B、1は0nM、2は10nM、3は100nM、4は1000nM、以上すべて最終濃度)、5 μ Lのヒト血清を加え、37℃、60分間インキュベートし、それに90 μ LのH₂Oを加えた。そこから5 μ Lをとって、それに5 μ L還元SDS sample buffer(x2)を加えた。そのうち5 μ Lを12.5% gelにアプライし、泳動した。泳動終了後一晩オートラジオグラフィにかけ、その後フィルムを現像した。その結果、血清非存在下と同様の結果を得た(図6B)。

【0024】BLMAによるプロウロキナーゼ(pro-uPA)の活性化

10 μ Lのpro-uPA(最終濃度20nM)、10

μ LのSpectrozyme UK(活性型ウロキナーゼの特異的基質)(最終濃度100 μ M)、10 μ LのCaCl₂(最終濃度1mM)、20 μ LのBLMA(最終濃度0-190nM)を加え、TBS/Tバッファー中で37℃、3分ごとに0-60分まで405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(BIORAD)を用いて測定した。その結果、図6Dに示すように、BLMAはpro-uPAの活性化をもたらすことが示された。

【0025】実施例9

BLMAによる血液凝固第X因子の活性化(図7)

BLMAによる血液凝固第X因子の開裂(図7のB)を以下のように調べた。5 μ Lの血液凝固第X因子(最終濃度2 μ M)、5 μ LのBLMA(最終濃度0, 30, 100, 300nM)を加え、CaCl₂(最終濃度1

mM)を含むTBS/Tバッファー中で37℃、120分間インキュベートした。その後3.3μLの還元SDS-sample buffer (x4)を加え、そのうち12μLを、12.5% gelにアプライした。泳動終了後、染色、乾燥を行なった(図7A)。さらに、生成したフラグメントのN末端アミノ酸配列を実施例7と同様の方法で同定した(表3)。BLMAは濃度依存的に血液凝固第X因子のB鎖のAsp³⁴-Leu

35間(図7B中の矢印1)、および活性化開裂部位であるB鎖のLys⁵²-Ile⁵³間(図7B中の矢印2)の開裂をもたらした(図7A、Bおよび表3)。その結果、B鎖のSer¹-Asp³⁴断片と、A鎖とB鎖のLeu³⁵-Lys²⁵⁴断片がジスルフィド結合で連結された分子を生成した。

【0026】

【表3】

フラグメント	バシロライシンMAの作用により生ずる血液凝固第X因子断片のN末端アミノ酸配列 各分析サイクルに出現したアミノ酸(回収 pmol)				
	1	2	3	4	5
1	X(-)	V(2.4)	A(4.0)	Q(3.2)	A(3.0)
2	L(2.2)	L(2.8)	D(1.5)	F(5.9)	X(-)
3	I(0.6)	V(0.6)	G(2.8)	G(2.6)	Q(0.9)
4	A(9.0)	N(8.4)	S(2.8)	F(9.2)	L(9.0)

【0027】BLMAによる血液凝固第X因子の活性化
10μL血液凝固第X因子(最終濃度20nM)、10μLのSpectrozyme Xa(活性型血液凝固第X因子の特異的基質)(最終濃度100μM)、10μLのCaCl₂(最終濃度1mM)、20μLのBLMA(最終濃度0-100nM)を加え、TBS/Tバッファー中で37℃、6分ごとに0-120分まで405nmの吸光度を測定した。その結果、BLMAは図7Cに示すように血液凝固第X因子の活性化をもたらした。

【0028】実施例10

BLMAによるプロトロンビンの活性化(図8)
BLMAによるプロトロンビンの活性化は、以下の方法で測定した。12.5μLのプロトロンビン(最終濃度20nM)、12.5μLのSpectrozyme TH(最終濃度100μM)、12.5μLのCaCl₂(最終濃度1mM)、12.5μLのBLMA(最終濃度0-400nM)を加え、TBS/Tバッファー中で37℃、6分ごとに0-120分まで405nmの吸光度を測定した。図8に示すようにBLMAは濃度依存的にプロトロンビンを活性化した。

<配列の総数>2

配列番号1

<210>1

<211>2107

<212>DNA

<213>Bacillus megaterium A9542

<400>1

```

caacataaat gattttcata tagtttaaat aggtaaaaaa gacttattgc aaaaggttta      60
ttcttaattt tcataataat aggaatatta aaataatata tagacgtagt aatttttaaat      120
tgctataatg ttgctaatta tcacaattga cagaaaaatt gcggttaatta aatttactag      180
ggatagggag aaaaaaact                                                    198
atg aaa aag aaa aaa cag gct tta aag gta tta tta tca gtt ggt            243
met Lys Lys Lys Lys Gln Ala Leu Lys Val Leu Leu Ser Val Gly
-245                               -240                               -235

```

【0029】実施例11

BLMAによるプロテインCの活性化(図9)
12.5μLのヒトプロテインC(最終濃度20nM)、12.5μLのBLMA(最終濃度0-40nM)、12.5μLのS2336(活性型プロテインCに特異的な基質)(最終濃度100μM)、12.5μLのCaCl₂(最終濃度1mM)を加え、TBS/Tバッファー中で37℃、6分ごとに0-120分まで405nmの吸光度を測定した。その結果、図9に示すように、BLMAは濃度依存的にプロテインCの活性化をもたらした。

【0030】

【発明の効果】以上述べたように、本発明の菌の生産する酵素BLMAは、プラスミノーゲンを基質として限定分解して、新生血管抑制効果を有するアンジオスタチン様断片、および優れた血栓溶解作用を示すミニプラスミノーゲン様断片を産生する。またBLMAは血漿セリンプロテアーゼ群の活性化をもたらし、活性型血液凝固第X因子、活性型プロテインCなどの活性型血漿セリンプロテアーゼの製造に優れた効果をもたらす。

【配列番号】

atc ctt tct tca tca ttt gct ttt gca cat acg agc agt gcc gcg Ile Leu Ser Ser Ser Phe Ala-Phe Ala His Thr Ser Ser Ala Ala -230 -225 -220	288
cca aat aat gta ctt tca acc gaa aag tat aac aaa gaa att aaa Pro Asn Asn Val Leu Ser Thr Glu Lys Tyr Asn Lys Glu Ile Lys -215 -210 -205	333
tct cct gag ttt att tct gga aag ctt tca gcc cca tca tca cag Ser Pro Glu Phe Ile Ser Gly Lys Leu Ser Ala Pro Ser Ser Gln -200 -195 -190	378
aaa gct caa gac gtc gta ttt cat tat atg aat aca aat aaa gac Lys Ala Gln Asp Val Val Phe His Tyr Met Asn Thr Asn Lys Asp -185 -180 -175	423
aaa tat aaa tta gga aac gaa aat gct caa aac tca ttt aaa gtg Lys Tyr Lys Leu Gly Asn Glu Asn Ala Gln Asn Ser Phe Lys Val -170 -165 -160	468
aca gaa gta gtg aaa gat ccc gtt gaa caa gta acc gtt gta cgc Thr Glu Val Val Lys Asp Pro Val Glu Gln Val Thr Val Val Arg -155 -150 -145	513
ttg cag cag gta tat aat aat att cct gtt tgg gga tct act caa Leu Gln Gln Val Tyr Asn Asn Ile Pro Val Trp Gly Ser Thr Gln -140 -135 -130	558
tta gca cac gta gcg aaa gat gga acc tta aaa gtt gta tca ggt Leu Ala His Val Ala Lys Asp Gly Thr Leu Lys Val Val Ser Gly -125 -120 -115	603
aca gta gct cct gat tta gat aaa aag gaa aag cta aaa ggc cag Thr Val Ala Pro Asp Leu Asp Lys Lys Glu Lys Leu Lys Gly Gln -110 -105 -90	648
aag caa gtt gac agc aaa aag gcg att caa aca gcg gaa aaa gac Lys Gln Val Asp Ser Lys Lys Ala Ile Gln Thr Ala Glu Lys Asp -95 -90 -85	693
tta ggc ttt aaa ccg acg tat gaa aaa tcc cct tca tct gaa ctg Leu Gly Phe Lys Pro Thr Tyr Glu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Leu -80 -75 -70	738
tat gtt tat caa aat ggt tca gac aca acg tat gct tat gta gta Tyr Val Tyr Gln Asn Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Ala Tyr Val Val -65 -60 -55	783
aat ttg aat ttc tta aat cct gaa cca ggc aac tat tat tac ttt Asn Leu Asn Phe Leu Asn Pro Glu Pro Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe -50 -45 -40	828
glt gat gct att agc ggt aaa gtg cta gat aag tac aat aca att Val Asp Ala Ile Ser Gly Lys Val Leu Asp Lys Tyr Asn Thr Ile -35 -30 -25	873
gat tcc gta gct ggt cca aaa gcc gat gtg aag caa gcg gca aag Asp Ser Val Ala Gly Pro Lys Ala Asp Val Lys Gln Ala Ala Lys -20 -15 -10	918
ccg gca gcg aaa cct gta aca ggc aca aat gct att ggc tca ggt Pro Ala Ala Lys Pro Val Thr Gly Thr Asn Ala Ile Gly Ser Gly -5 -1 1 5 10	963
aaa gga gtg ctt gga gat act aaa tcg tta aag aca acg tta tct	1008

Lys Gly Val Leu Gly Asp Thr Lys Ser Leu Lys Thr Thr Leu Ser	
15 20 25	
agt tct act tac tac tta caa gat aat aca aga ggg gcg aca atc	1053
Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Ala Thr Ile	
30 35 40	
tat acg tac gat gca aaa aat cgt aca tct ctt cca ggt acg cta	1098
Tyr Thr Tyr Asp Ala Lys Asn Arg Thr Ser Leu Pro Gly Thr Leu	
45 50 55	
tgg gca gac acg gat aat acg tac aat gca acc cgc gat gca gct	1143
Trp Ala Asp Thr Asp Asn Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Asp Ala Ala	
60 65 70	
gca gta gat gct cac tat tat gca ggt gtg acg tat gat tat tat	1188
Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr	
75 80 85	
aaa aac aaa ttt aac cgc aac tcc tat gac aat gca gga gct gcg	1233
Lys Asn Lys Phe Asn Arg Asn Ser Tyr Asp Asn Ala Gly Ala Ala	
90 95 100	
cta aaa tca act gtt cat tat agc agc ggc tac aac aat gcg ttt	1278
Leu Lys Ser Thr Val His Tyr Ser Ser Gly Tyr Asn Asn Ala Phe	
105 110 115	
tgg aat ggc tct caa atg gta tat gga gat gga gat gga act act	1323
Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Thr Thr	
120 125 130	
ttt gtt ccg cta tca gga ggg tta gat gtt atc gga cat gaa ttg	1368
Phe Val Pro Leu Ser Gly Gly Leu Asp Val Ile Gly His Glu Leu	
135 140 145	
acg cat gcg gtc aca gaa aga agt tct aat tta atc tat caa tat	1413
Thr His Ala Val Thr Glu Arg Ser Ser Asn Leu Ile Tyr Gln Tyr	
150 155 160	
gaa tca ggt gca tta aac gaa gcg att tcc gat att ttc gga aca	1458
Glu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr	
165 170 175	
ttg gta gaa tac tat gac aac cga aat cca gat tgg gaa att gga	1503
Leu Val Glu Tyr Tyr Asp Asn Arg Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly	
180 185 190	
gaa gat att tac acg cct gga aca agc ggt gat gcc ctt cgt tca	1548
Glu Asp Ile Tyr Thr Pro Gly Thr Ser Gly Asp Ala Leu Arg Ser	
195 200 205	
atg agc aac cca gca aaa tat gga gat ccg gat cat tat tca aag	1593
Asn Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Met Ser	
210 215 220	
cgc tat aca ggt tct agt gac aac ggc gga gtt cat aca aac agc	1638
Arg Tyr Thr Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Val His Thr Asn Ser	
225 230 235	
ggt att atc aac aaa gct gcc tac ttg cta gct aac gga gga acg	1683
Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Leu Ala Asn Gly Gly Thr	
240 245 250	
cat tac ggg gtt aat gta aca ggc atc ggc ggc gat aag cta ggg	1728

His Tyr Gly Val Asn Val Thr Gly Ile Gly Gly Asp Lys Leu Gly
 255 260 265
 aaa att tat tac cgt gct aat acg cta tac ttc act cag tct aca 1773
 Lys Ile Tyr Tyr Arg Ala Asn Thr Leu Tyr Phe Thr Gln Ser Thr
 270 275 280
 acg ttt agc caa gcg cgt gca ggt tta gta caa gct gct gct gat 1818
 Thr Phe Ser Gln Ala Arg Ala Gly Leu Val Gln Ala Ala Ala Asp
 285 290 295
 cta tac ggt tca ggc tct caa gaa gta att tca gta ggc aag tca 1863
 Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gln Glu Val Ile Ser Val Gly Lys Ser
 300 305 310

 ttt gac gca gtt ggt gtt caa 1884
 Phe Asp Ala Val Gly Val Gln
 315
 taagtataa accaaaagtc gcaagataaa tgaggtatct tacgactctc tatactacct 1944
 tactaccaat aaaggagtac tcgtataaat atattacagt actcctttat tttatggttaa 2004
 taaataagga aaacagattt cttcttgatc tataaaaatc cacttcttat tcctcccttt 2064
 tatgtccatt ccgaattata ctgttgcttg tttaaatgaa gaa 2107

配列番号 2

<210>2

<211>562

<212>PRT

<213>Bacillus megaterium A9542株

<400>2

Met Lys Lys Lys Lys Gln Ala Leu Lys Val Leu Leu Ser Val Gly
 5 10 15
 Ile Leu Ser Ser Ser Phe Ala Phe Ala His Thr Ser Ser Ala Ala
 20 25 30
 Pro Asn Asn Val Leu Ser Thr Glu Lys Tyr Asn Lys Glu Ile Lys
 35 40 45
 Ser Pro Glu Phe Ile Ser Gly Lys Leu Ser Ala Pro Ser Ser Gln
 50 55 60
 Lys Ala Gln Asp Val Val Phe His Tyr Met Asn Thr Asn Lys Asp
 65 70 75
 Lys Tyr Lys Leu Gly Asn Glu Asn Ala Gln Asn Ser Phe Lys Val
 80 85 90
 Thr Glu Val Val Lys Asp Pro Val Glu Gln Val Thr Val Val Arg
 95 100 105
 Leu Gln Gln Val Tyr Asn Asn Ile Pro Val Trp Gly Ser Thr Gln
 110 115 120
 Leu Ala His Val Ala Lys Asp Gly Thr Leu Lys Val Val Ser Gly
 125 130 135
 Thr Val Ala Pro Asp Leu Asp Lys Lys Glu Lys Leu Lys Gly Gln
 140 145 150
 Lys Gln Val Asp Ser Lys Lys Ala Ile Gln Thr Ala Glu Lys Asp
 155 160 165
 Leu Gly Phe Lys Pro Thr Tyr Glu Lys Ser Pro Ser Ser Glu Leu
 170 175 180
 Tyr Val Tyr Gln Asn Gly Ser Asp Thr Thr Tyr Ala Tyr Val Val

185	190	195
Asn Leu Asn Phe	Leu Asn Pro Glu Pro	Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe
200	205	210
Val Asp Ala Ile	Ser Gly Lys Val Leu	Asp Lys Tyr Asn Thr Ile
215	220	225
Asp Ser Val Ala	Gly Pro Lys Ala Asp	Val Lys Gln Ala Ala Lys
230	235	240
Pro Ala Ala Lys	Pro Val Thr Gly Thr	Asn Ala Ile Gly Ser Gly
245	250	255
Lys Gly Val Leu	Gly Asp Thr Lys Ser	Leu Lys Thr Thr Leu Ser
260	265	270
Ser Ser Thr Tyr	Tyr Leu Gln Asp Asn	Thr Arg Gly Ala Thr Ile
275	280	285
Tyr Thr Tyr Asp	Ala Lys Asn Arg Thr	Ser Leu Pro Gly Thr Leu
290	295	300
Trp Ala Asp Thr	Asp Asn Thr Tyr Asn	Ala Thr Arg Asp Ala Ala
305	310	315
Ala Val Asp Ala	His Tyr Tyr Ala Gly	Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr
320	325	330
Lys Asn Lys Phe	Asn Arg Asn Ser Tyr	Asp Asn Ala Gly Ala Ala
335	340	345
Leu Lys Ser Thr	Val His Tyr Ser Ser	Gly Tyr Asn Asn Ala Phe
350	355	360
Trp Asn Gly Ser	Gln Met Val Tyr Gly	Asp Gly Asp Gly Thr Thr
365	370	375
Phe Val Pro Leu	Ser Gly Gly Leu Asp	Val Ile Gly His Glu Leu
380	385	390
Thr His Ala Val	Thr Glu Arg Ser Ser	Asn Leu Ile Tyr Gln Tyr
395	400	405
Glu Ser Gly Ala	Leu Asn Glu Ala Ile	Ser Asp Ile Phe Gly Thr
410	415	420
Leu Val Glu Tyr	Tyr Asp Asn Arg Asn	Pro Asp Trp Glu Ile Gly
425	430	435
Glu Asp Ile Tyr	Thr Pro Gly Thr Ser	Gly Asp Ala Leu Arg Ser
440	445	450
Met Ser Asn Pro	Ala Lys Tyr Gly Asp	Pro Asp His Tyr Ser Lys
455	460	465
Arg Tyr Thr Gly	Ser Ser Asp Asn Gly	Gly Val His Thr Asn Ser
470	475	480
Gly Ile Ile Asn	Lys Ala Ala Tyr Leu	Leu Ala Asn Gly Gly Thr
485	490	495
His Tyr Gly Val	Asn Val Thr Gly Ile	Gly Gly Asp Lys Leu Gly
500	505	510
Lys Ile Tyr Tyr	Arg Ala Asn Thr Leu	Tyr Phe Thr Gln Ser Thr
515	520	525
Thr Phe Ser Gln	Ala Arg Ala Gly Leu	Val Gln Ala Ala Ala Asp
530	535	540

Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Gln Glu Val Ile Ser Val Gly Lys Ser

545

550

555

Phe Asp Ala Val Gly Val Gln

560

【図面の簡単な説明】

【図1】 SDS-PAGEによる微生物代謝物の探索による微生物の選別

【図2】 バシロライシンMAのカルボキシルメチルセルロースクロマトグラフィーによる精製

【図3】 バシロライシンMAによるプラスミノゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノゲン様断片の生成

【図4】 プラスミノゲンのアンジオスタチン様断片による血管内皮細胞の増殖の阻害

【図5】 プラスミノゲンのミニプラスミノゲン様断片の血栓溶解酵素プラスミンへの変換効率

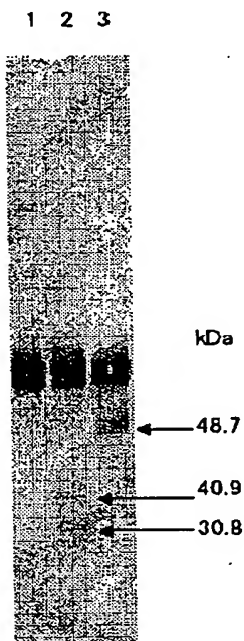
【図6】 バシロライシンMAによるプロウロキナーゼ (pro-uPA) 活性化

【図7】 バシロライシンMAによる血液凝固第X因子の開裂と活性化

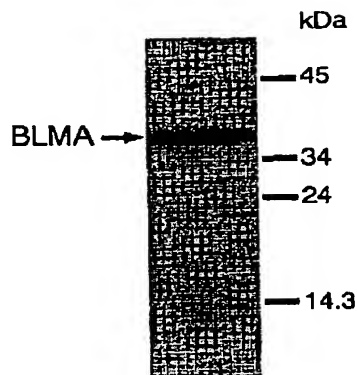
【図8】 バシロライシンMAによるプロトロンビンの活性化

【図9】 バシロライシンMAによるプロテインCの活性化

【図1】

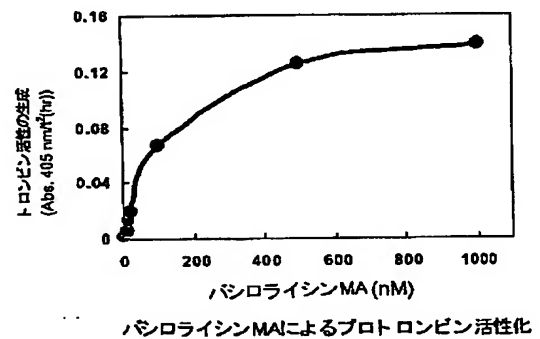


【図2】



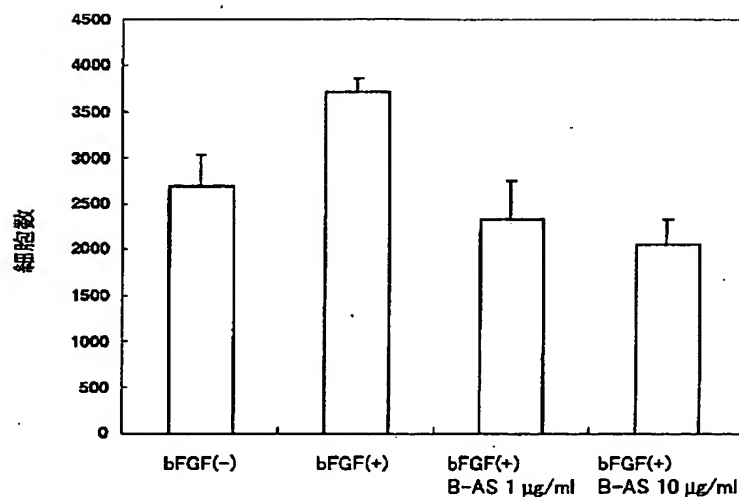
バチラス メガテリウム A9542株
からのバシロライシンMAの精製

【図8】



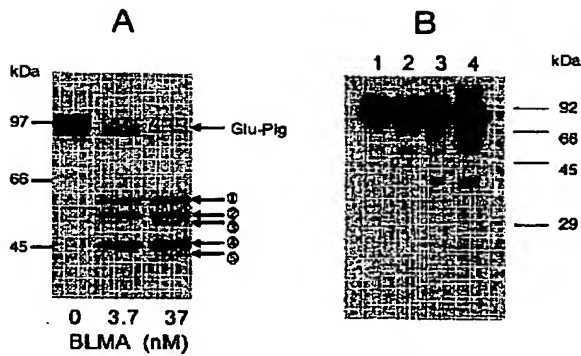
スクリーニングの結果

【図4】

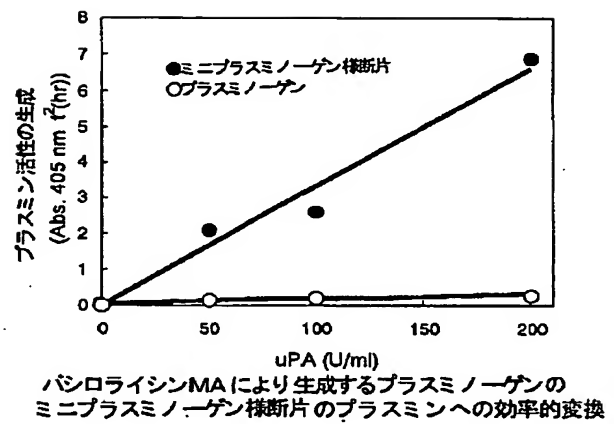


BLMAにより生成するプラスミノゲンのアンジオスタチン様断片 (B-AS)
による血管内皮細胞の増殖阻害

【図3】

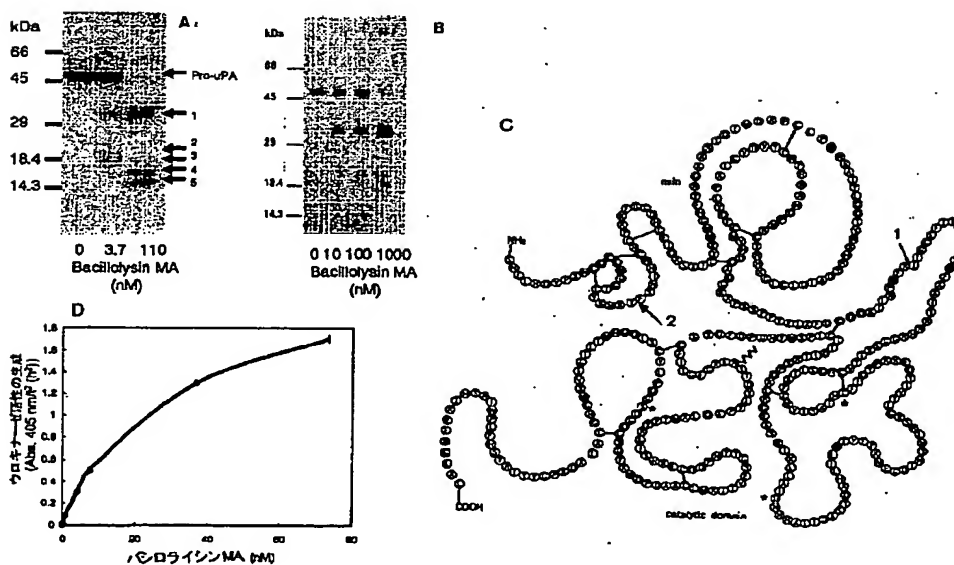


【図5】

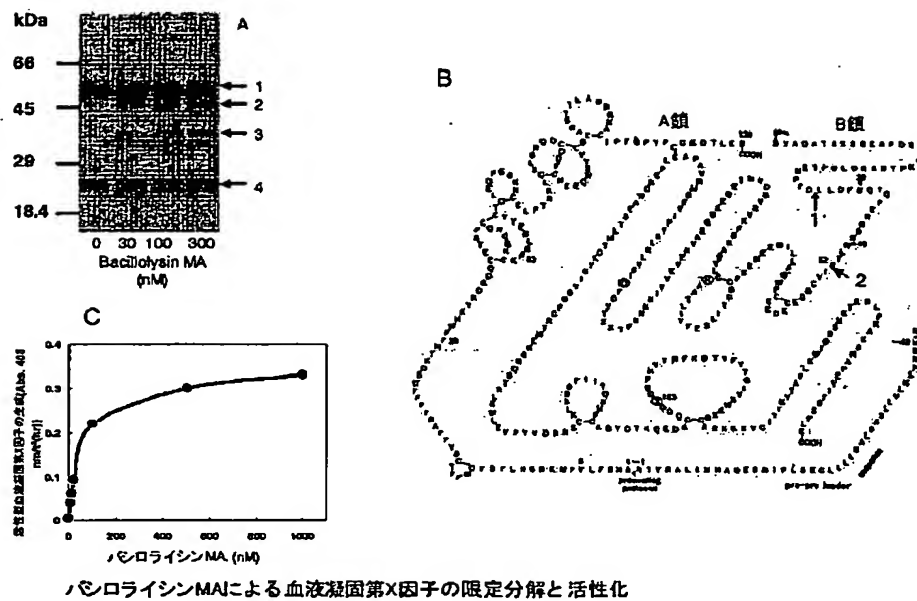


ノロライシンMAによるプラスミノゲンからのアンジオスタチン様断片とミニプラスミノゲン様断片の生成

【図6】

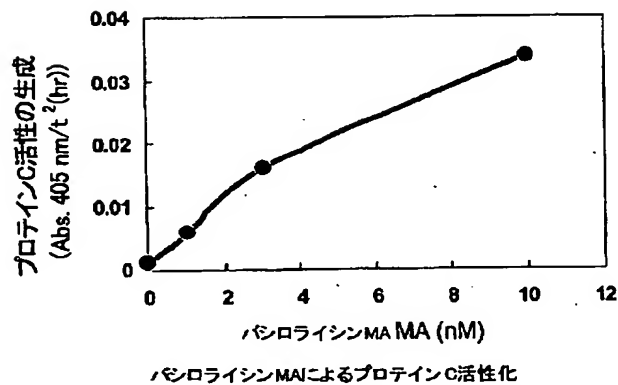


【図7】



バシロライシンMAによる血液凝固第X因子の限定分解と活性化

【図9】



バシロライシンMAによるプロテインC活性化

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 43/00

1 1 1

C 1 2 N 9/54

4 H 0 4 5

C 1 2 N 9/54

C 1 2 P 21/02

B

15/09

Z N A

C 0 7 K 1/18

C 1 2 P 21/02

(C 1 2 N 1/21

// C 0 7 K 1/18

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 N 1/21

(C 1 2 N 9/54

C 1 2 R 1:07)

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 N 9/54

)

C 1 2 R 1:07)

A 6 1 K 37/47

(C 1 2 N 15/09

Z N A

37/547

C 1 2 R 1:07)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 R 1:07)

(72) 発明者 佐藤 勉
東京都府中市幸町 2 - 40 B - 406

F ターム (参考) 4B024 BA14 BA16 CA03 HA01
4B050 CC01 DD02 FF09E LL01
LL05
4B064 AG01 CA21 CC03 CC24 CD20
DA05
4B065 AA15X BA22 CA33 CA44
4C084 AA02 AA07 BA08 BA22 BA23
DC02 DC03 DC05 NA14 ZA362
ZA542 ZB262 ZC192
4H045 AA20 AA30 BA10 CA40 EA24
FA70 GA10 GA23

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.